

### บทที่ 3

#### อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะเกสรเพศผู้เป็นหมันที่ไม่มีกลีบดอกของดาวเรือง

การทดลองนี้แบ่งเป็น 4 การทดลองย่อยดังนี้

#### การทดลองที่ 1.1 การเตรียมต้นดาวเรือง และประเมินลักษณะดอกดาวเรืองรุ่นที่ 2

การทดลองนี้เป็นการเตรียมต้นดาวเรือง และประเมินลักษณะดอกดาวเรืองลูกผสมรุ่นที่ 2 เพื่อใช้ศึกษาในการทดลอง

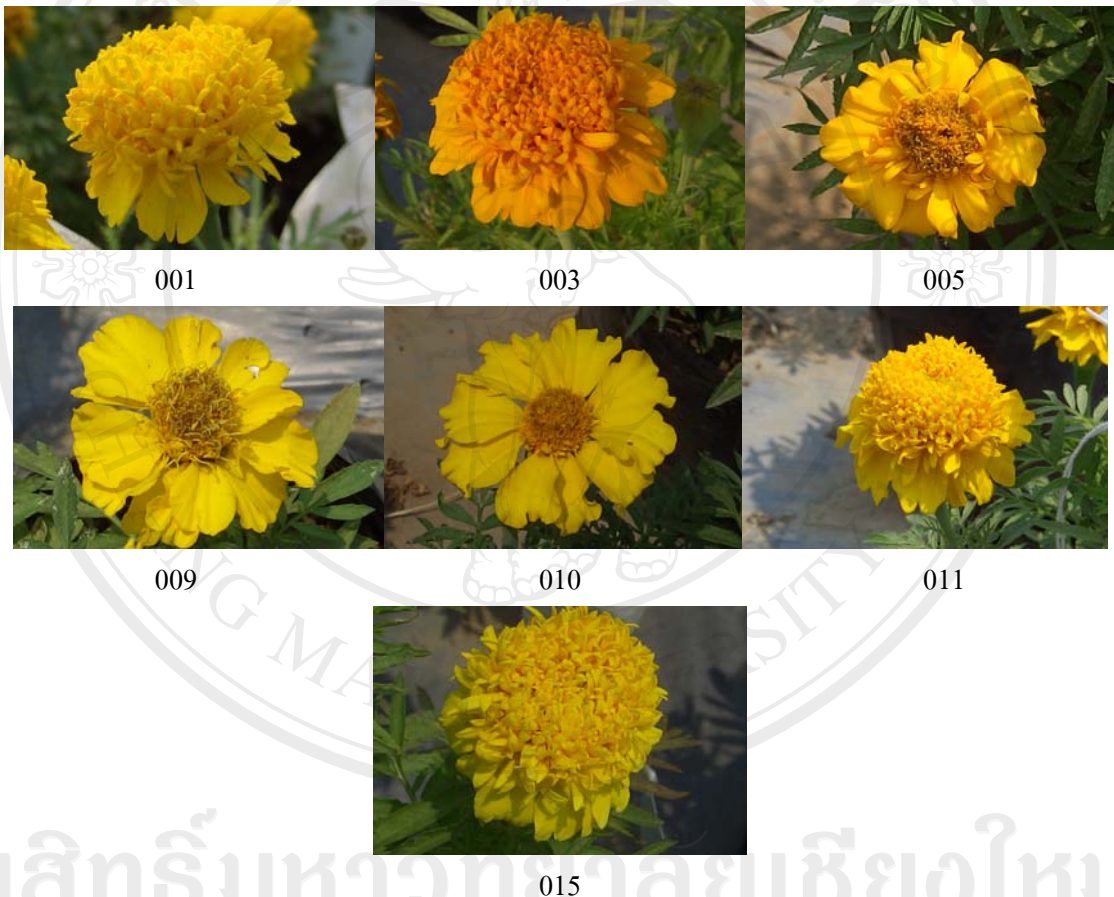
##### 1.1.1 วัสดุ และอุปกรณ์

1.1.1.1 เมล็ดพันธุ์ดาวเรือง จากการผสมพันธุ์ดาวเรืองพันธุ์การค้า และดาวเรืองพันธุ์แท้ (ศุภนารี, ติดต่อส่วนตัว) เมล็ดลูกผสมรุ่นที่ 1 ที่ได้ เมื่อนำไปปลูกพบว่า มีการกระจายตัวได้ลูกผสมรุ่นที่ 1 หลายลักษณะ และได้มีการควบคุมให้ดาวเรืองลูกผสมรุ่นที่ 1 แต่ละต้นมีการผสมตัวเองแล้วเก็บเมล็ดไว้ โดยมีการเก็บแบบจดบันทึกลักษณะดอกของดาวเรืองแต่ละต้น ศุภนารีได้แบ่งเมล็ดดาวเรืองรุ่นที่ 2 ไปปลูก และพบว่าดอกดาวเรืองรุ่นที่ 1 บางลักษณะในแต่ละกลุ่มผสม ให้ลูกรุ่นที่ 2 ที่มีลักษณะเกสรเพศผู้เป็นหมันที่ไม่มีกลีบดอก จึงได้นำเมล็ดดาวเรืองรุ่นที่ 2 ที่ศุภนารีเก็บไว้จากดอกต้นที่นี้อยู่ภายในกลุ่มผสมเดียวกัน ที่มีดอกเหมือนกับดอกรุ่นที่ 1 ที่ให้ลูกรุ่นที่ 2 แบบเกสรเพศผู้เป็นหมันที่ไม่มีกลีบดอก นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ โดยลักษณะดอกรุ่นที่ 1 ที่ได้คัดเลือกจากแต่ละกลุ่มผสมได้แสดงในภาพ 3.1 จำนวน 7 กลุ่มผสม คือ

- |                         |                 |
|-------------------------|-----------------|
| 1. Antigua Gold × SN1   | ให้รหัสเป็น 001 |
| 2. Jamaica Gold × SN1   | ให้รหัสเป็น 003 |
| 3. Inca Gold × SN1      | ให้รหัสเป็น 005 |
| 4. Antigua Gold × SN3   | ให้รหัสเป็น 009 |
| 5. Jamaica Gold × SN3   | ให้รหัสเป็น 010 |
| 6. Inca Gold × SN3      | ให้รหัสเป็น 011 |
| 7. Sovereign Gold × SN4 | ให้รหัสเป็น 015 |

1.1.1.2 วัสดุปลูก และสารเคมี ได้แก่ ตะกร้าพลาสติก กระบะเพาะ กระดาษหนังสือพิมพ์ ถูงพลาสติกสีดำขนาด 5×10 นิ้ว วัสดุเพาะ คือ ทรายร่อน ขุยมะพร้าว จี๋เก่า แกลบ อัตราส่วน 1: 1: 1 วัสดุปลูก คือ ดิน จี๋เก่าแกลบ ปุ๋ยคอก อัตราส่วน 1: 1: 1 และปุ๋ยเคมี สูตร 15-15-15

1.1.1.3 วัสดุอื่นๆ ได้แก่ สมุด ปากกา ดินสอ ไม้บรรทัด กล้องถ่ายรูป ป้ายติดรายละเอียด



ภาพ 3.1 ลักษณะดอกดาวเรืองลูกผสมรุ่นที่ 1 ที่ควบคุมให้ผสมตัวเอง เพื่อผลิตดาวเรืองรุ่นที่ 2

Copyright © by Chiang Mai University  
All rights reserved

### 1.1.2 วิธีการ

1.1.2.1 การปลูก และการดูแลต้นดาวเรือง แบ่งเป็น 3 ขั้นตอนดังนี้

1) การเพาะเมล็ดดาวเรือง นำเมล็ดดาวเรืองรุ่นที่ 2 จากข้อ 1.1.1.1 มาเพาะในตะกร้าพลาสติก โดยใช้วัสดุเพาะ คือ ทรายร่อน ขุยมะพร้าว จี๋เก่าแกลบ อัตราส่วน 1: 1: 1 ก่อนเพาะเมล็ดดาวเรืองนำกระดาษหนังสือพิมพ์รองพื้นตะกร้าพลาสติกที่ใช้เพาะ เพื่อป้องกันไม่ให้

วัสดุเพาะร่วนหล่น แล้วเทวัสดุเพาะจนเต็มตะกร้า รดน้ำให้ชุ่ม หลังจากนั้นทำร่องบนวัสดุเพาะ ลึกประมาณ 1 ซม. และให้แต่ละร่องห่างกันประมาณ 5 ซม. นำเมล็ดดาวเรืองหยอดเรียงในร่อง โดยให้แต่ละเมล็ดห่างกันประมาณ 3-5 ซม. แล้วกลบร่องด้วยวัสดุเพาะเพื่อกลบเมล็ด รดน้ำให้ชุ่มอีกครั้ง ดินป้ายรายละเอียดของเมล็ดพันธุ์ดาวเรืองที่ทำการเพาะ หลังจากนั้นดูแลโดยการรดน้ำวันละ 2 ครั้ง เช้า และเย็น

2) การย้ายกล้า ทำการย้ายกล้าเมื่อต้นกล้าอายุ 20-30 วัน หรือเมื่อต้นกล้ามีใบจริง 3-5 ใบ ย้ายปลูกลงถุงพลาสติกสีดำ ขนาด 5×10 นิ้ว โดยใช้วัสดุปลูก คือ ดิน ขี้เถ้าแกลบ ปุ๋ยคอก อัตราส่วน 1: 1: 1 ก่อนย้ายต้นกล้าต้องรดน้ำวัสดุปลูกในถุงพลาสติกให้ชุ่ม ใช้ช้อนขุดต้นกล้าจากกระบะเพาะ โดยให้มีวัสดุเพาะติดรากต้นกล้ามากที่สุด ย้ายต้นกล้าปลูกในถุงพลาสติก จำนวน 1 ต้นต่อถุง หลังจากนั้นรดน้ำให้ชุ่มอีกครั้ง และเขียนป้ายติดรายละเอียดของดาวเรืองแต่ละต้น การย้ายกล้าดาวเรืองควรทำช่วงเย็น เพราะช่วงกลางคืนอากาศเย็น ทำให้ต้นกล้าดาวเรืองตั้งตัวได้ดีกว่าช่วงกลางวันที่มีอากาศร้อน ซึ่งทำให้กล้าดาวเรืองสูญเสียน้ำ ต้นกล้าเหี่ยวและอาจตายได้

3) การปลิดยอด และการดูแลต้นดาวเรือง ทำการปลิดยอด เมื่อต้นดาวเรืองมีใบจริงขนาดใหญ่ 4-6 คู่ใบ และส่วนยอดมีใบ 1-2 คู่ใบ วิธีการปลิดยอด โดยใช้มือซ้ายจับใบคู่บนสุด แล้วใช้มือขวาดึงส่วนยอดลงทางด้านข้าง จนส่วนยอดหลุดออกมา เพื่อให้ดาวเรืองแตกกิ่งแขนง การดูแลต้นดาวเรืองโดยการรดน้ำวันละครั้ง ทุกวัน และให้ปุ๋ยสูตร 15-15-15 อัตราส่วนประมาณ 1 ช้อนชาต่อต้น ทุก 20 วัน ฝักรอบโคนต้นดาวเรือง ลึกประมาณ 2 ซม. ให้ห่างจากโคนต้น 8-10 ซม. แล้วรดน้ำให้ชุ่ม

1.1.2.2 การประเมินลักษณะดาวเรืองรุ่นที่ 2 ทำโดยบันทึกลักษณะดอก จำนวนดอกย่อยต่อช่อ จำนวนดอกย่อยชั้นนอกต่อช่อ รูปทรงดอกย่อยชั้นนอก ลักษณะปลายกลีบดอกย่อยชั้นนอก ลักษณะ โคนกลีบดอกย่อยชั้นนอก ลักษณะขอบกลีบดอกย่อยชั้นนอก จำนวนดอกย่อยชั้นในต่อช่อ และรูปทรงดอกย่อยชั้นใน โดยทำการสุ่มนับต้นละ 5 ดอก และบันทึกภาพลักษณะดอกดาวเรืองแต่ละต้น

## การทดลองที่ 1.2 การผสมเกสรดาวเรืองลูกผสมรุ่นที่ 2

การทดลองนี้เป็นการผสมเกสรดาวเรืองรุ่นที่ 2 โดยเลือกดอกแบบเกสรเพศผู้เป็นหมันที่ไม่มีกลีบดอก เพื่อรักษาสายพันธุ์เกสรเพศผู้เป็นหมันที่ไม่มีกลีบดอก

### 1.2.1 วัสดุ และอุปกรณ์

1.2.1.1 พืชทดลอง ต้นแม่พันธุ์ คือ ต้นดาวเรืองรุ่นที่ 2 ดอกแบบเกสรเพศผู้เป็นหมันที่ไม่มีกลีบดอก โดยมีต้นพ่อพันธุ์ 2 พันธุ์ คือ ต้นพ่อพันธุ์ที่ใช้สร้างลูกผสมรุ่นที่ 1 (SN4) และต้นพี่น้องจากกลุ่มผสมเดียวกันที่มีเกสรเพศผู้ปกติ เนื่องจากลักษณะเกสรเพศผู้เป็นหมันไม่สามารถผสมตัวเองได้ จึงต้องการละอองเรณูจากต้นอื่นในผสมเกสร เพื่อรักษาสายพันธุ์เกสรเพศผู้เป็นหมันที่ไม่มีกลีบดอก ลูกที่ได้จากการผสมเกสรระหว่างต้นพี่น้องของดาวเรืองลูกผสมรุ่นที่ 2 เรียกว่าลูกผสมรุ่นที่ 3 ส่วนลูกที่ได้จากการผสมกลับ (backcross) กับพ่อพันธุ์ เรียกว่า BC1

1.2.1.2 วัสดุที่ใช้ผสมเกสร ได้แก่ ถุงกระดาษ ลวดเย็บกระดาษ พู่กันขนอ่อน มีดผ่าตัด ปากคีบ แอลกอฮอล์ และป้ายติดรายละเอียด

1.2.1.3 วัสดุอื่นๆ ได้แก่ สมุด ปากกา ดินสอ

### 1.2.2 วิธีการ

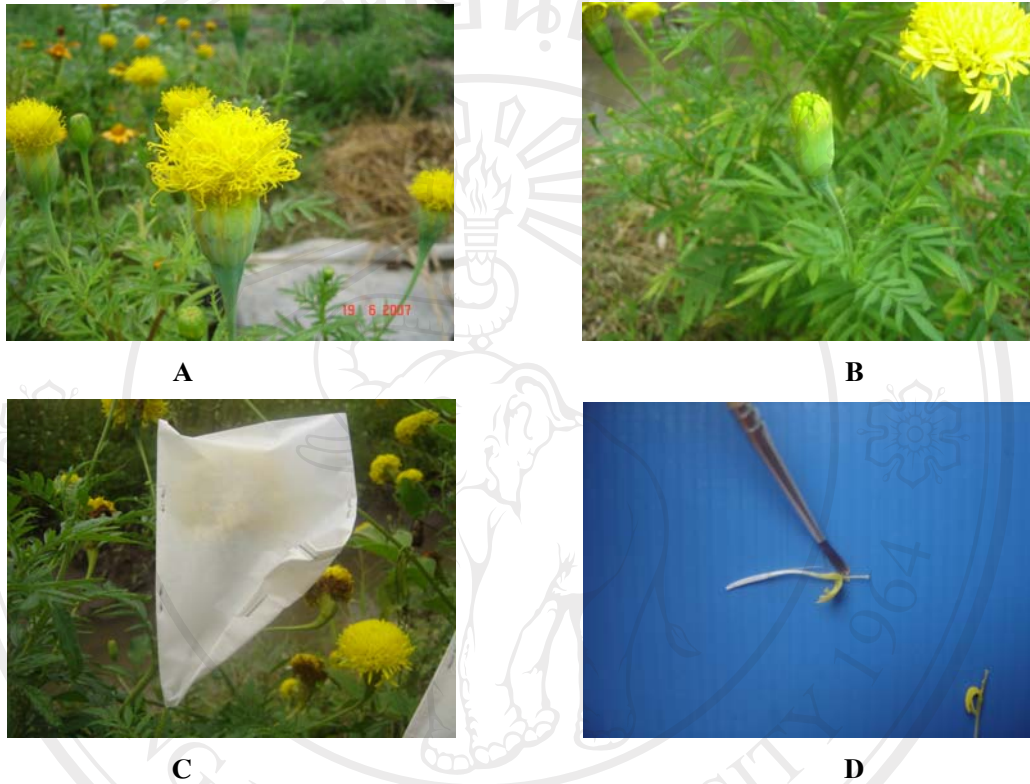
1.2.2.1 การเตรียมต้นแม่พันธุ์ โดยคัดเลือกต้นเกสรเพศผู้เป็นหมันที่ไม่มีกลีบดอก (ภาพ 3.2 A) ในดาวเรืองรุ่นที่ 2 กลุ่มดอกที่คัดเลือกด้วยถุงกระดาษก่อนดอกบาน (ภาพ 3.2 C) เพื่อป้องกันไม่ให้ดอกแม่พันธุ์ได้รับการผสมจากละอองเรณูของต้นอื่น และช่วยรักษาความชื้นภายในดอกแม่พันธุ์ (อดิศร, 2535)

1.2.2.2 การเตรียมต้นพ่อพันธุ์ โดยคลุมดอกต้นพ่อพันธุ์ด้วยถุงกระดาษ เช่นเดียวกับต้นแม่พันธุ์ และต้องคลุมดอกก่อนดอกบาน (ภาพ 3.2 B) เพื่อป้องกันไม่ให้ละอองเรณูของต้นอื่นเจือปน

1.2.2.3 การผสมเกสร จากรายงานการผสมพันธุ์ดาวเรืองของ พนิดา (2529) พบว่าช่วงเวลาที่เหมาะสมเริ่มแรก คือ เวลา 9.00–11.00 น. และช่วงเวลาที่ยอดเกสรเพศเมียขอมรับละอองเรณู คือ เวลา 7.00–13.00 น. ดังนั้นสามารถทำการผสมเกสรภายในวันเดียวได้ โดยใช้พู่กันแตะละอองเรณูจากต้นพ่อพันธุ์ (ภาพ 3.2 D) แล้วนำพู่กันแตะบนยอดเกสรเพศเมียของต้นแม่พันธุ์ และเกลี่ยให้ทั่ว ทำซ้ำหลายๆ ครั้ง โดยทำการผสมเกสรกลุ่มผสมละ 7 ดอก และเมื่อเปลี่ยนกลุ่มผสมใช้แอลกอฮอล์ชุบพู่กันเพื่อกำจัดละอองเรณูที่ติดพู่กัน เมื่อผสมเกสรเสร็จแล้วคลุมดอกแม่พันธุ์



ด้วยถุงกระดาษ และเขียนป้ายติดรายละเอียดของกลุ่มผสม ทำการผสมซ้ำอีกครั้งในวันถัดไป หลังจากนั้นให้ดอกแม่พันธุ์ที่ผ่านการผสมเกสรเสร็จแล้วเจริญเติบโต เมื่อดอกแห้งก้าน จึงเก็บเมล็ดพันธุ์ โดยเก็บไว้ในถุงปิดผนึกเพื่อป้องกันความชื้น และเขียนรายละเอียดของกลุ่มผสม



ภาพ 3.2 ลักษณะดอกดาวเรืองที่ใช้ผสมพันธุ์ วิธีการคลุมดอก และการเก็บละอองเรณู  
 A ดอกแม่พันธุ์ B ดอกในระยะที่พร้อมคลุมดอก C การคลุมดอกดาวเรือง  
 D การใช้ฟู่กันเก็บละอองเรณู

การทดลองที่ 1.3 การปลูก และประเมินลักษณะดอกดาวเรือง ที่ได้จากการผสมเกสรของดอกดาวเรืองรุ่นที่ 2 แบบเกษตรผู้เป็นหมันที่ไม่มีกลีบดอก

การทดลองนี้เป็นการนำเมล็ดดาวเรืองจากการทดลองที่ 1.2 มาปลูก และประเมินลักษณะดอกดาวเรือง

### 1.3.1 วัสดุ และอุปกรณ์

1.3.1.1 เมล็ดพันธุ์ดาวเรืองที่ได้จากการทดลองที่ 1.2

1.3.1.2 วัสดุปลูก สารเคมี และวัสดุอื่นๆ เช่นเดียวกับ การทดลองที่ 1.1

### 1.3.2 วิธีการ

1.3.2.1 การปลูก และประเมินลักษณะดอกดาวเรืองที่ได้จากการผสมเกสรของดาวเรืองลูกผสมรุ่นที่ 2 แบบดอกเกสรเพศผู้เป็นหมันที่ไม่มีกลีบดอก ทำเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1.1

### การทดลองที่ 1.4 การผสมเกสรดาวเรืองรุ่นที่ 3 และการประเมินลักษณะดอกดาวเรืองรุ่นที่ 4

เนื่องจากดาวเรืองรุ่นลูกที่ได้จากการผสมเกสรของดาวเรืองรุ่นที่ 2 แบบเกสรเพศผู้เป็นหมันที่ไม่มีกลีบดอก มีลักษณะดอกแบบสมบูรณ์เพศทั้งหมด จึงคัดเลือกต้นดาวเรืองรุ่นที่ 3 จากการผสมเกสรของต้นที่นิ่งในดาวเรืองรุ่นที่ 2 ทำการผสมตัวเอง เพื่อศึกษาการถ่ายทอดลักษณะเกสรเพศผู้เป็นหมันที่ไม่มีกลีบดอกในดาวเรือง

#### 1.4.1 วัสดุ และอุปกรณ์

1.4.1.1 ต้นดาวเรืองรุ่นที่ 3 จากการผสมเกสรของต้นที่นิ่งรุ่นที่ 2 ระหว่างดอกแบบเกสรเพศผู้เป็นหมันที่ไม่มีกลีบดอก และดอกเกสรเพศผู้ปกติ

1.4.1.2 วัสดุที่ใช้ผสมเกสร ได้แก่ ถุงกระดาษ ลวดเย็บกระดาษ และป้ายติดรายละเอียด

1.4.1.3 วัสดุอื่นๆ ได้แก่ สมุด ปากกา ดินสอ

#### 1.4.2 วิธีการ

1.4.2.1 การผสมตัวเองของดาวเรืองรุ่นที่ 3 โดยคลุมดอกดาวเรืองจากต้นที่คัดเลือกด้วยถุงกระดาษ เพื่อให้เกิดการผสมตัวเอง ก่อนคลุมดอกต้องแน่ใจว่าดอกดาวเรืองยังไม่ได้รับการผสมก่อนแล้ว (ระยะที่เหมาะสมสำหรับการคลุมดอก คือ ระยะที่กลีบดอกยังไม่บาน) โดยทำการคลุมดอก จำนวน 7 ดอกต่อต้น เขียนป้ายติดรายละเอียดของต้นดาวเรืองรุ่นที่ 3 ที่ทำการผสมตัวเอง เมื่อดาวเรืองติดเมล็ด นำเมล็ดที่ได้ไปปลูก และประเมินลักษณะดาวเรืองรุ่นที่ 4 เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1.1

การทดลองที่ 2 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของดอกดาวเรืองที่ตอบสนองต่ออุณหภูมิเมื่อได้รับอุณหภูมิต่ำ

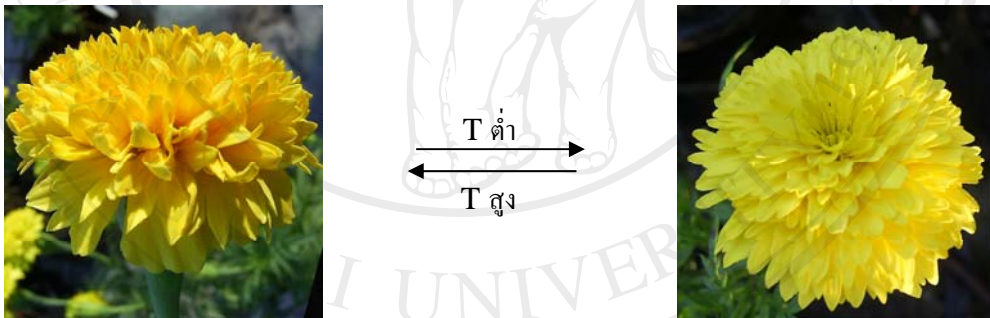
การทดลองนี้แบ่งเป็น 3 การทดลองย่อยดังนี้

### การทดลองที่ 2.1 การเตรียมต้นดาวเรืองที่ใช้ศึกษา

การทดลองนี้เป็นการเตรียมต้นดาวเรืองที่มีการตอบสนองต่ออุณหภูมิ เพื่อใช้ในการทดลอง

#### 2.1.1 วัสดุ และอุปกรณ์

2.1.1.1 พืชทดลอง คือ ดาวเรืองรุ่นที่ 2 (จากการทดลองที่ 1.1) ที่พบลักษณะดอกที่สามารถตอบสนองต่ออุณหภูมิ (สามารถเปลี่ยนจากดอกแบบพู่กลมเป็นดอกที่มีเฉพาะดอกย่อยชั้นนอก ซึ่งมีเกสรเพศผู้เป็นหมัน เมื่อได้รับอุณหภูมิต่ำ และสามารถเปลี่ยนกลับเป็นดอกแบบพู่กลมเมื่อได้รับอุณหภูมิสูง) (ภาพ 3.3)



ภาพ 3.3 ลักษณะดอกดาวเรืองที่ตอบสนองต่ออุณหภูมิ

#### 2.1.1.2 วัสดุอื่นๆ เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1.1

#### 2.1.2 วิธีการ

##### 2.1.2.1 คัดเลือกต้นดาวเรืองรุ่นที่ 2 ลักษณะดอกตอบสนองต่ออุณหภูมิ

##### 2.1.2.2 ทำการผสมตัวเองของดาวเรืองรุ่นที่ 2 จากข้อ 2.1.2.1 เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1.3 จำนวน 5 ดอกต่อต้น เมื่อได้เมล็ดดาวเรืองที่ผ่านการผสมตัวเองแล้ว แบ่งเมล็ดเป็น

2 ส่วน เพื่อทำการทดลองที่ 2.2 และ 2.3 ต่อไป

## การทดลองที่ 2.2 การทดสอบการตอบสนองต่ออุณหภูมิต่ำของดอกดาวเรือง

การทดลองนี้ นำเมล็ดดาวเรืองจากการทดลองที่ 2.1 ปลูกช่วงฤดูหนาว เพื่อพิสูจน์การตอบสนองต่ออุณหภูมิต่ำของดอกดาวเรือง

### 2.2.1 วัสดุ และอุปกรณ์

2.2.1.1 เมล็ดดาวเรืองที่ได้จากการทดลองที่ 2.1 ส่วนแรก

2.2.1.2 วัสดุปลูก สารเคมี และวัสดุอื่นๆ เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1.1

### 2.2.2 วิธีการ

2.2.2.1 ปลูกดาวเรืองรุ่นที่ 3 เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1.1 จำนวน 107 ต้น ช่วงฤดูหนาวระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2549 ถึงกุมภาพันธ์ 2550 ซึ่งมีอุณหภูมิเฉลี่ยสูงสุดและต่ำสุด คือ  $31.2^{\circ}\text{C}$  และ  $11.7^{\circ}\text{C}$  ตามลำดับ

2.2.2.2 สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลง และบันทึกลักษณะของดาวเรืองรุ่นที่ 3 ดอกแบบพุ่มที่ตอบสนองต่ออุณหภูมิ เมื่อได้รับอุณหภูมิต่ำช่วงฤดูหนาว

## การทดลองที่ 2.3 ศึกษาลักษณะทางกายวิภาควิทยาของดอกที่ตอบสนองต่ออุณหภูมิ เมื่อได้รับอุณหภูมิต่ำ

การทดลองนี้ นำเมล็ดดาวเรืองจากการทดลองที่ 2.1 ปลูกช่วงฤดูร้อน และคัดเลือกต้นที่มีดอกแบบพุ่มเข้าห้องควบคุมอุณหภูมิ เพื่อศึกษาลักษณะทางกายวิภาคของดอกดาวเรืองที่ได้รับอุณหภูมิต่ำ โดยศึกษาจากเนื้อเยื่อดอกดาวเรืองที่ตัดตามขวาง ตามวิธีการศึกษาเนื้อเยื่อแบบ paraffin embedding ของ Johansen (1940) และ Sass (1966)

### 2.3.1 วัสดุ และอุปกรณ์

2.3.1.1 พืชทดลอง คือ เมล็ดดาวเรืองจากการทดลองที่ 2.1 ส่วนที่ 2

2.3.1.2 ห้องควบคุมอุณหภูมิ ที่  $20^{\circ}\text{C}$

2.3.1.3 วัสดุปลูก และสารเคมี เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1.1

2.3.1.4 เครื่องมือ และอุปกรณ์ ที่ใช้ในการศึกษาเนื้อเยื่อแบบ paraffin embedding ดังนี้

- 1) เครื่องดูดอากาศ
- 2) ตู้อบที่ปรับอุณหภูมิเป็น  $56^{\circ}\text{C}$
- 3) แผ่นให้ความร้อน (hot plate)



- 4) กระจกปอนด์พับเป็นกระจกสำหรับใส่พาราฟินฝังเนื้อเยื่อ  
ดอกดาวเรือง
- 5) แท่งไม้สี่เหลี่ยมขนาด  $1.5 \times 1.5 \times 1.5$  ลบ.ซม. ที่ผ่านการต้มให้  
อิมตัวด้วยพาราฟิน
- 6) เครื่องตัดชิ้นส่วนพืชแบบล้อหมุน (rotary microtome)
- 7) กล้องจุลทรรศน์แบบ dissecting microscope และ stereo microscope
- พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ
- 8) เครื่องอุ่นแผ่นสไลด์ที่ปรับอุณหภูมิเป็น  $40^{\circ}\text{C}$
- 9) อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ ขวดแก้วสำหรับเก็บตัวอย่าง ขวดแก้ว  
พร้อมฝาปิดสำหรับย้อมสี (staining jar) ปีกเกอร์ แผ่นกระจกสไลด์ (slide) และแผ่นกระจกปิดสไลด์  
(cover slip)
- 10) อุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่ ตะเกียงแอลกอฮอล์ เข็มเย็บ มีดผ่าตัด  
พร้อมใบมีด หลอดหยด (dropper) ปากคีบ กระจกขาว พู่กัน ป้ายติดภาชนะ สมุด ปากกา ดินสอ ไม้  
บรรทัด กล้องถ่ายรูป และเวอร์เนียร์คาลิเปอร์

#### 2.3.1.5 สารเคมี ที่ใช้ในการศึกษาเนื้อเยื่อแบบ paraffin embedding ดังนี้

- 1) น้ำยาที่ใช้รักษาสภาพเซลล์ (fixative) ได้แก่ FAA (formalin acetic acid-alcohol) (ภาคผนวก ก)
- 2) น้ำยาที่ดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydrating solution) (ภาคผนวก ก)
- 3) สารตัวกลางที่ใช้ฝังเนื้อเยื่อ (embedding media) ได้แก่ พาราฟิน  
เหลว (paraffin oil) และ Paraplast
- 4) น้ำยาคิดเนื้อเยื่อพืชให้กับติดแผ่นสไลด์ (adhesive) (ภาคผนวก ก)
- 5) สีย้อมเนื้อเยื่อ ใช้สี Dalafied's hematoxylin (ภาคผนวก ก)
- 6) น้ำยาทำความสะอาดเนื้อเยื่อ (clearing reagent) คือ Xylene
- 7) สารตัวกลางสำหรับปิดแผ่นสไลด์ (mounting media) คือ Canada balsam

#### 2.3.2 วิธีการ

2.3.2.1 ปลูกดาวเรืองรุ่นที่ 3 เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1.1 จำนวน 107 ต้น  
ช่วงฤดูร้อน ระหว่างเดือนมีนาคม ถึงมิถุนายน 2550 ซึ่งมีอุณหภูมิเฉลี่ยสูงสุด และต่ำสุด คือ  $35.7^{\circ}\text{C}$   
และ  $21.2^{\circ}\text{C}$  ตามลำดับ

#### 2.3.2.2 คัดเลือกต้นดาวเรืองรุ่นที่ 3 ที่มีลักษณะแบบพุ่มกลม

2.3.2.3 วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของดอกดาวเรืองจากข้อ 2.3.2.2 ที่มีขนาดไม่เกิน 1 ซม. ด้วยเวอร์เนียคาลิเปอร์ และเขียนป้ายชื่อติด โดยแบ่งดอกเป็น 3 ขนาดดังนี้

- 1) ดอกที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 0.31–0.50 ซม.
- 2) ดอกที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 0.51–0.70 ซม.
- 3) ดอกที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 0.71–1.00 ซม.

2.3.2.4 ย้ายต้นดาวเรืองจากข้อ 2.3.2.3 ไว้ที่ห้องควบคุมอุณหภูมิ (20 °ซ) และแบ่งต้นดาวเรืองเป็น 3 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 4 ต้น (โดยการสุ่ม) ดังนี้

- 1) นำต้นดาวเรืองเข้าห้องควบคุมอุณหภูมิ 1 วัน
- 2) นำต้นดาวเรืองเข้าห้องควบคุมอุณหภูมิ 3 วัน
- 3) นำต้นดาวเรืองเข้าห้องควบคุมอุณหภูมิ 5 วัน

2.3.2.5 ย้ายต้นดาวเรืองจากข้อ 2.3.2.4 ปลูกลงที่สภาพอุณหภูมิปกติ 5 วัน

2.3.2.6 เก็บตัวอย่างส่วนดอกดาวเรืองจากข้อ 2.3.2.5 จำนวน 6 ดอกต่อต้น แช่ใน FAA ที่บรรจุอยู่ในขวดแก้ว นำขวดดังกล่าวไปใส่ในเครื่องดูดอากาศเพื่อไล่ฟองอากาศออกจากเนื้อเยื่อดอก หลังจากนั้นนำขวดเนื้อเยื่อดอกดาวเรืองเก็บที่อุณหภูมิห้องนานอย่างน้อย 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปผ่านขั้นตอนการดิ่งน้ำออกจากเซลล์

2.3.2.7 นำดอกดาวเรืองจากข้อ 2.3.2.6 มาผ่านขั้นตอนการดิ่งน้ำออกจากเซลล์ โดยให้เนื้อเยื่อดอกดาวเรืองผ่านน้ำยาที่มีความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในน้ำยาจาก 50% จนถึง 100% จากนั้นนำเนื้อเยื่อดอกผ่าน 100% TBA ตามด้วยน้ำยาที่ประกอบด้วย TBA และ พาราฟินเหลว อัตราส่วน 1: 1 แล้วนำเนื้อเยื่อดอกไปผ่านขั้นตอนของการแทรกพาราฟินเข้าไปในเนื้อเยื่อ (infiltration)

2.3.2.8 ถ่ายเนื้อเยื่อดอกดาวเรืองลงในขวดแก้วที่บรรจุพาราฟินที่หลอม นำขวดแก้วไปเก็บไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 56 °ซ นานประมาณ 2-3 สัปดาห์ หรือมากกว่า จนกระทั่งพาราฟินแทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อของดอกจนเต็มที

2.3.2.9 นำเนื้อเยื่อดอกดาวเรืองฝังในพาราฟิน จัดตำแหน่งของดอกให้อยู่ในตำแหน่ง และระนาบที่ต้องการ

2.3.2.10 นำแท่งพาราฟินที่ตัดแต่งเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าที่มีชิ้นส่วนของดอกดาวเรืองอยู่ตรงกลางติดกับแท่งไม้ จากนั้นนำไปตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบล้อหมุน โดยตัดเนื้อเยื่อตามขวาง หน้า 15-18 ไมครอน

2.3.2.11 ตัดแผ่นริบบอน (paraffin ribbon) ของเนื้อเยื่อดอกดาวเรืองกับแผ่นสไลด์ด้วยน้ำยายึดเนื้อเยื่อพืช แล้ววางแผ่นสไลด์บนเครื่องอุ่นสไลด์จนแผ่นริบบอนแห้ง และติดกับแผ่นสไลด์

2.3.2.12 นำแผ่นสไลด์ที่ละลายพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อดอกแล้วไปย้อมสีด้วยสี Dalafied's hematoxylin

2.3.2.13 ปิดแผ่นสไลด์ด้วยกระจกปิดสไลด์ โดยใช้ Canada balsam ยึด

2.3.2.14 เมื่อแผ่นสไลด์แห้งสนิทนำแผ่นสไลด์ไปศึกษาลักษณะทางกายวิภาคของเนื้อเยื่อดอกดาวเรืองภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และบันทึกภาพ